Arbeiten des pflanzenphysiologischen Institutes der k. k. Wiener Universität.

XVIII. Untersuchungen über den Einfluss des Lichtes auf die Chlorophyllbildung bei intermittirender Beleuchtung.

Von Dr. **Karl Mikosch** und Dr. **Adolf Stöhr.**

Bunsen und Roscoe [1] entdeckten, dass gewisse chemische Processe, die durch Licht hervorgerufen werden, in ihrem Verlaufe eine eigenthümliche Erscheinung zeigen. Es beginnt nämlich der vom Lichte unabhängige chemische Process erst einige Zeit nach dem Beginn der Beleuchtung, dauert hingegen nach einer Verdunklung noch geraume Zeit fort. Die in der Zeiteinheit gebildete Quantität des neuen chemischen Individuums nimmt in aufeinanderfolgenden Zeittheilchen bis zu einem Maximum zu. Dies sind drei charakteristische Erscheinungen, an welche sich noch andere Merkmale anschliessen, die von Bunsen und Roscoe unter dem Namen der photochemischen Induction zusammengefasst wurden.

Wiesner [2] legte sich die Frage vor, ob auch die Entstehung des Chlorophylls im Lichte als ein photochemischer Process aufzufassen sei und entschied die Frage im bejahenden Sinne. Vor Allem sei aus der betreffenden Abhandlung als wichtigstes Argument folgender Versuch wiedergegeben: Bei vollständigem Lichtausschluss gezogene 500—600 Gerstenkeimlinge, die nur drei bis nahezu fünf Minuten dem Lichte ausgesetzt waren, wurden mit Alkohol erschöpft. Selbst nachdem die weingeistigen Auszüge mit wenig Benzol ausgeschüttelt wurden, war spectroskopisch kein Chlorophyll zu erkennen. Dennoch lassen bedeutend geringere

---

[1] Poggendorf's Annalen. Bd. 100, pag. 481 ffd.

[2] Entstehung des Chlorophylls in der Pflanze, Wien, 1877, pag. 87.

Quantitäten der genannten Keimlinge nach einer Beleuchtung von fünf Minuten bei der damals verwendeten Lichtquelle deutlich Chlorophyll durch die spectroskopische Prüfung erkennen. Es war also die Menge des gewonnenen Chlorophylls weder der Menge des pflanzlichen Materials, noch der Anzahl der Beleuchtungszeiteinheiten proportional, vielmehr muss angenommen werden, dass in den ersten Minuten überhaupt kein Chlorophyll gebildet wurde. [1]

Nachdem Wiesner in seiner Monographie des Heliotropismus die Frage nach Inductionsvorgängen, die durch das Licht hervorgerufen werden, auch auf dem Gebiete der heliotropischen Wachsthumserscheinungen wieder aufwarf, [2] und eine neue Seite dieser Inductionsvorgänge durch eine neue einfache Methode kennen lehrte [3], entschlossen wir uns auf Anregung Professor Wiesner's die photochemische Induction bei der Chlorophyllbildung in jener Richtung und mit Hilfe jener Methode, welche uns die unten citirte Monographie an die Hand gab, zu studiren.

Bevor wir daher das nächste Ziel und die Methode unserer vorliegend angeführten Beobachtungen bezeichnen, ist es unerlässlich, auf die Fortschritte in dem Verständnisse der heliotropischen Krümmungen, wie dieselben durch Wiesner gewonnen wurden, aufmerksam zu machen. Wir beziehen uns dabei auf das Capitel des zweiten Theiles der „Heliotropischen Erscheinungen“. Wiesner nimmt nämlich für das Zustandekommen des Heliotropismus eine photomechanische Induction in Analogie zur photochemischen an. In der That setzt man für den Effect an Stelle eines chemischen Processes einen nach der Lichtquelle orientirten Wachsthumsvorgang, ferner für das Mass der chemischen Induction an die Stelle der Quantität des in einer Zeiteinheit neugebildeten Körpers etwa die Abnahme des Krümmungsradius eines heliotropisch gekrümmten Organes in der Zeiteinheit, ferner für die Überwindung des Verbindungwiderstandes, welchen Bunsen und Roscoe annehmen, die Schaffung

[1] Bezüglich der anderen für photochemische Induction bei der Entstehung des Chlorophylls sprechenden Argumente und Beobachtungen s. l. c., pag. 87 ffd. Denkschr. d. k. Akad. der Wissensch., 39. Bd.

[2] Die heliotropischen Erscheinungen im Pflanzenreiche, I. Th., pg. 201.

[3] Die heliotropischen Erscheinungen im Pflanzenreiche, II. Th., pg. 23.

einer Disposition für eine (später eintretende) Krümmung, so ist die Analogie photochemischer Induction mit der photomechanischen klargelegt. Es ist nicht nöthig, die Beleuchtung so lange fortzusetzen, bis der erste nachweisbare heliotropische Effect gesetzt wird; daraus folgt, dass für die Induction heliotropischer Krümmungen als eine bisher für die photochemische Induction noch nicht studirte Eigenschaft festzuhalten ist, dass nicht nur eine Wirkung, die im Lichte eintrat, noch im Dunklen einige Zeit fortdauert, sondern dass auch eine Wirkung, die während der Beleuchtung noch nicht da war, im Dunklen eintritt. Der Beginn der Wirkung ist mit anderen Worten eine Function der Zeit und des Lichtes. Das Verdienst Wiesner's besteht nun darin, diese doppelte Abhängigkeit der heliotropischen Wirkungen näher erforscht zu haben. Die Zeit des Eintrittes der ersten nachweisbaren Wirkung scheint bei gleicher Temperatur und gleichem Turgor durch die Dauer der Beleuchtung nicht verändert zu werden und einzig von der Individualität der Pflanze abhängig zu sein. Es ist nicht nöthig, die ganze Zeit bis zum Eintritte der Wirkung zu beleuchten. Es genügt vielmehr ein viel kleinerer Zeitwerth. Wird dieser kleinste noch wirksame Zeitwerth der Beleuchtung überschritten, so äussert sich die Wirkung des Lichtes keineswegs in einer Verzögerung oder Beschleunigung der Inductionszeit. Wichtig ist, dass eine nicht mehr wirksame Lichtzeit dadurch wirksam gemacht werden kann, dass sie nach einem gewissen empirisch zu suchenden Rhythmus durch zwischengeschaltete Verdunklungspausen auf eine grössere Zeitstrecke ausgedehnt wird. Es ist daher eine wesentliche Eigenschaft der photomechanischen Induction, dass bei der continuirlichen Beleuchtung bis zum Eintritte des Effectes Licht im Überschuss geboten wird. Es kann ohne Änderung des Effectes die Dauer der continuirlichen Beleuchtung abgekürzt werden. Es kann aber auch durch intermittirende Beleuchtung die Dauer der Lichteinwirkung ohne Änderung des Effectes verringert werden. Das wahre Minimum der zu einem Effecte erforderlichen Lichtdauer wird erst durch die letztere Beleuchtungsart erreicht.

Berücksichtigt man die durchgängige Analogie zwischen photomechanischer und photochemischer Induction, so darf dieses

Criterium für eine Eigenschaft der Licht-Inductionserscheinungen überhaupt in consequenter Weise angenommen werden.

Es war zunächst Ziel und Zweck unserer Beobachtungen, festzustellen, ob für die Entstehung des Chlorophylls im Lichte das Analoge gilt, wie für das Zustandekommen der heliotropischen Krümmungen; das heisst, ob auch der Zeitpunkt, in welchem die erste Chlorophyllspur spectroskopisch sichtbar wird, von der Beleuchtungsdauer unabhängig ist, die Chlorophyllbildung selbst aber durch eine gewisse, von der gesammten Zeit von Beginn der Beleuchtung bis zum Eintritte des Effectes verschiedene Zeit der Beleuchtung bedingt wird, deren Minimum durch intermittirende Beleuchtung erreicht wird.

Wir führten unsere Versuche sowohl im Gaslichte als im diffusen Tageslichte aus; ersteres wurde benützt, um die bei intermittirender Beleuchtung gebildeten ersten Spuren von Chlorophyll zu constatiren; letzteres, um den Effect derselben Beleuchtungsart bei mit freiem Auge sichtbarem Ergrünen aufzufinden. Die als Lichtquelle verwendete Gasflamme brannte unter dem constanten Druck einer Wassersäule von 13·5 Mm. und ihre Leuchtkraft kam genau der von 6·5 Walratkerzen gleich. Wiesner wandte dieselbe Flamme bei Durchführung seiner heliotropischen Versuche an und bezeichnete sie als Normalflamme. [1]

Zur Verdunkelung der Versuchspflanzen diente uns derselbe Apparat, den auch Wiesner und Einer von uns bei den Versuchen über die photomechanische Induction benützte, [2] bezüglich dessen genauer Beschreibung wir auf den zweiten Theil der unten erwähnten Monographie des Heliotropismus verweisen und hier nur kurz erwähnen wollen, dass der wesentlichste Bestandtheil des Apparates ein doppeltwandiger, blank polirter Messingcylinder (Sturz) war, der in einem rechteckigen geschwärzten Holzrahmen derart befestigt wurde, dass er mit Leichtigkeit gehoben und gesenkt werden konnte.

---

[1] S. die heliotropischen Erscheinungen, I. Th., pag. 175.

[2] Die heliotropischen Erscheinungen, II. Th., pag. 23.

Als Versuchspflanzen wählten wir Keimlinge von Gerste, Hafer, Kresse und Rettig. Dieselben wurden in kleinen Gartentöpfchen unter solchen Verhältnissen gezogen (sie standen in einem Dunkelkasten bedeckt von doppelten Pappe- oder Zinkcylindern), dass eine Entstehung von Chlorophyll unmöglich war. Um übrigens in dieser Hinsicht bei unseren Versuchen ganz sicher zu gehen, wurde vor jedem Versuche von dem vorhandenen Materiale eine Probe mit einem möglichst geringen Quantum Alkohol extrahirt und das Extract bei einer Schichtendicke von 10 Ctm. spectroskopisch untersucht; nur solches Material wurde zum Versuch verwendet, welches nach Ausweis der spectroskopischen Prüfüng sich als vollkommen chlorophyllfrei erwiesen hatte.

Als Kriterium für das Vorhandensein von Chlorophyll benutzten wir den Absorptionsstreifen I des Chlorophyllspectrums. Nach Pringsheim [1] soll dieser Streifen (zwischen den Fraunhofer'schen Linien *B* und *C* gelegen) nicht nur dem Chlorophyll-, sondern auch dem Etiolinspectrum angehören und bei einer Schichtendicke von 10 Ctm. in weingeistigen Etiolinlösungen schon deutlich in Erscheinung treten. Wir haben in Weingeistauszügen von in völliger Dunkelheit gezogenen Keimlingen diesen Streifen nie gesehen, wohl aber wenn die Aussaat bei nicht völligem Ausschluss von Licht erwuchs. Hieraus und aus dem Umstande, dass der Absorptionsstreifen I stets mit Deutlichkeit hervortritt, wenn das alkoholische Extract von in völliger Dunkelheit aufgezogenen und durch kurze Zeit beleuchteten Keimlingen untersucht wird, schliessen wir, dass das Etiolin Pringsheim's mit einer Spur von Chlorophyll verunreinigt war. Sollte thatsächlich das Etiolin Pringsheim's völlig chlorophyllfrei gewesen sein — was jedoch von ihm nicht bewiesen wurde — so könnte man dies mit unseren Beobachtungen nur unter der Annahme in Einklang bringen, dass unter dem Einfluss des Lichtes die Etiolinbildung begünstigt wird, was von vorneherein sehr unwahrscheinlich ist und wofür keine Thatsachen vorliegen.

---

[1] Untersuchungen über das Chlorophyll: 1. Abth. Über die Absorptionsspectra der Chlorophyllfarbstoffe, Monatsber. der k. Akad. der Wissensch. zu Berlin, October 1874.

Wir müssen desshalb an der Ansicht festhalten, dass das Auftreten des Absorptionsstreifens I im Weingeistauszuge von im Dunkeln gezogenen und durch kurze Zeit beleuchtet gewesenen Keimlingen die Gegenwart von Chlorophyll anzeigt. Unter der, wie schon bemerkt, sehr unwahrscheinlichen Annahme, dass der Absorptionsstreifen I die Gegenwart von im Lichte entstandenem Etiolin anzeigt, würde aus unseren Beobachtungen zu folgern sein, dass das Etiolin sowie das Chlorophyll durch den Process der photochemischen Induction entsteht. Doch vertreten wir hier aus schon angeführten Gründen diese Ansicht nicht, sondern folgern aus unseren Beobachtungen nur die Entstehung des Chlorophylls auf dem Wege der photochemischen Induction. Hier sei noch folgender Beobachtung Erwähnung gethan: In dem weingeistigen Extracte der Dunkelkeimlinge von Gerste, Kresse und Rettig nimmt man bei spectroskopischer Prüfung ausser der dem Etiolin angehörigen drei Absorptionsbänder in der stark brechbaren Hälfte des Spectrums noch einen mehr oder weniger deutlich hervortretenden Absorptionsstreifen im Orange wahr; schüttelt man die Lösung mit Benzol durch, so bleibt in dem alkoholischen Auszug der Streifen wie zuvor sichtbar, während im Benzolextract von einem Absorptionsstreifen nichts zu bemerken ist. Die alkoholische Lösung fluorescirt roth und es ist höchst wahrscheinlich, dass Fluorescenz und der erwähnte Streifen Merkmale eines und desselben Körpers sind, welcher aber selbstverständlich weder mit Chlorophyll noch mit Etiolin identisch ist. Bei gewisser Concentration der Lösung rückt nun dieser Streifen in die Nähe des Chlorophyllstreifens I und bei flüchtiger Beobachtung könnte er als letzterer selbst angesehen werden.

Bei den Versuchen im Gaslichte wurden die Versuchspflanzen in einer Entfernung = 1·5 M. von der Lichtquelle aufgestellt, derselben Entfernung, welche auch Wiesner bei seinen Versuchen über die Geschwindigkeit der Chlorophyllbildung angewendet hatte. [1]

I. Versuche mit Gerste und Hafer.

Die ersten Spuren von Chlorophyll können mit Zuhilfenahme des Spectroskops im alkoholischen Extract der Primordial-

[1] Entstehung des Chlorophylls in der Pflanze, pag. 82.

blätter genannter Pflanzen nach einer continuirlichen Beleuchtung von fünf Minuten nachgewiesen werden. (Temperatur = 20° C.) Am Ende einer continuirlichen Beleuchtung von 2·5 Minuten ist keine Chlorophyllbildung nachweisbar, wohl aber, wenn 2·5 Minuten Lichtzeit auf fünf Minuten derart vertheilt werden, dass die Pflanzen fünf Minuten hindurch eine Secunde beleuchtet, die nächste Secunde mittelst des Metallcylinders verdunkelt werden. Die Versuche wurden öfters wiederholt und immer in den aus den intermittirend beleuchteten Keimlingen gewonnenen Extracte der Absorptionsstreifen I nachgewiesen, während das Extract der durch 2·5 Minuten continuirlich beleuchteten Keimpflanzen nur das einfache Etiolinspectrum zeigte.

Weitere Versuche mit Gerste wurden im diffusen Tageslichte (an einem von der Sonne nicht direct bestrahlten Fenster) in folgender Art ausgeführt. Beiläufig 8 Ctm. hohe Gerstenkeimlinge wurden am bezeichneten Orte durch $6^1/_2$ Stunden (von 10^h Vormittags bis $4^1/_2{}^h$ Nachmittags) stehen gelassen (*a*). Dieselbe Zeit hindurch wurden Keimlinge derselben Aussaat an ebendemselben Fenster intermittirend beleuchtet, und zwar in einem Verhältniss von einer Secunde Licht und einer Secunde Dunkel (*b*). Beide Partien ergrünten, *b* wohl nicht so intensiv als *a*; letztere verdunkelten wir nun, während daneben die früher intermittirend beleuchteten Pflanzen der continuirlichen Beleuchtung überlassen blieben. Es zeigte sich, dass diese nach $1^1/_4$ Stunden denselben grünen Farbenton angenommen hatten, den die Keimlinge von *a* vor ihrer Verdunklung erreicht hatten. Die continuirlich beleuchteten Pflanzen hatten also in einem Zeitraum von $6^1/_2$ Stunden einen Ergrünungsgrad angenommen, den die intermittirend beleuchteten bereits in $4^1/_2$ Stunden Lichtzeit erreicht haben. Das Verhältniss der Lichtzeiten in diesen beiden Versuchen gestaltet sich wie 13:9. Zwei weitere Versuche mit derselben Pflanze ausgeführt ergaben ein noch günstigeres Verhältniss der Lichtzeiten, nämlich 4:2·5.

II. Versuche mit Kresse und Rettig.

Bei der während unserer Versuche herrschenden Temperatur von 21° C. traten die ersten Spuren von Chlorophyll bei Kressekeimlingen schon nach einer Beleuchtungszeit von 12·5 Minuten

auf. Es wurde daher von vollkommen chlorophyllfreiem Material eine Partie Keimlinge durch $6^1/_4$ Minuten continuirlich beleuchtet; hier war in dem Extracte kein Chlorophyll nachweisbar. Nun vertheilten wir durch Intermission dieselbe Lichtzeit von $6^1/_4$ Minuten auf eine Zeit von 12·5 Minuten (eine Secunde Licht, eine Secunde Dunkel), worauf ein ganz schwacher Absorptionsstreifen I im weingeistigen Extracte sichtbar wurde.

Nun wurde die Wirkung einer continuirlichen Beleuchtung von acht Minuten verglichen mit der einer intermittirenden von 12 Minuten (2 Secunden Licht, eine Secunde Dunkel, also acht Minuten Lichtzeit); als Resultat ergab sich in beiden Fallen ein gleich schwacher Absorptionsstreifen I.

Noch weniger präcis waren die aus den Versuchen mit Rettigkeimlingen gewonnenen Resultate; hier zeigte sich deutlich, dass es nicht so leicht ist, Pflanzen aufzufinden, welche die erwähnten Erscheinungen klar hervortreten lassen. Berücksichtigt man, dass die Materialien, aus denen das Chlorophyll im Lichte aufgebaut wird, nicht nothwendig bei jeder Art dieselben sein müssen; dass weiter der Chlorophyllbildungsprocess, wie Wiesner bereits früher nachgewiesen hat, bei verschiedenen Arten mit verschiedener Geschwindigkeit verläuft, und zieht man in Betracht, dass der Rhythmus für die intermittirende Beleuchtung aus keinerlei theorethischen Gründen vorher ausgewählt werden kann, sondern völlig empirisch erst gefunden werden muss und sich offenbar für eine geänderte Chlorophyllbildungsgeschwindigkeit selbst ändern wird, so erscheint das Verhalten von Kresse und Rettig vollkommen erklärlich.

III. Versuche über die Zerstörung von Chlorophylllösungen im Lichte.

Es schien uns interessant und wichtig, auch noch andere photochemische Vorgänge, welche für die Pflanze von Belang sind, in den Kreis unserer Beobachtungen zu ziehen und nachzusehen, ob nicht auch in diesen Fällen eine photochemische Induction vorhanden sei; zunächst kommen da die Kohlensäurezerlegung im Lichte und die Zerstörung von Chlorophylllösungen durch Oxydation im Lichte in Betracht. Was den ersteren

Vorgang betrifft, so musste von vornherein wegen Mangels einer geeigneten Methode der Gedanke an eine Lösung der gestellten Frage aufgegeben werden. Günstiger gestalteten sich die Verhältnisse für den zweiten Fall, die Zerstörung von Chlorophylllösungen im Lichte. Es ist durch die Untersuchungen Wiesner's gezeigt worden, [1] dass die Natur des Lösungsmittels des Chlorophylls einen bedeutenden Einfluss auf die Geschwindigkeit ausübt, mit welcher die Zerstörung des grünen Farbstoffes im Lichte vor sich geht. So verfärbt sich eine alkoholische Chlorophylllösung in der Sonne viel rascher als eine ätherische, diese rascher als eine Lösung in fettem Öle; am raschesten geht die Entfärbung bei einer Lösung von Chlorophyll in Terpentinöl vor sich.

In Hinblick nun auf diese Thatsachen war es ein Leichtes, das Verhalten von Chlorophylllösungen bei intermittirender und continuirlicher Beleuchtung zu studiren.

Wir bereiteten uns Chlorophylllösungen geringer Concentration in Terpentinöl und fanden, dass bei continuirlicher Beleuchtung in der Sonne die Entfärbung in vier Minuten eintrat. Lösungen derselben Concentration, welche durch dieselbe Zeit intermittirend (eine Secunde Licht, eine Secunde Dunkel) beleuchtet wurden, waren am Ende des Versuches noch grün. Erst bei intermittirender Beleuchtung von acht Minuten wurde die Entfärbung herbeigeführt. Weingeistige Lösungen verhielten sich ebenso.

Aus diesen Versuchen ergibt sich nun, dass bei der Zerstörung gelösten Chlorophylls bei Gegenwart von Sauerstoff im Lichte die photochemische Induction entweder gar keine Rolle spielt oder in so untergeordnetem Masse wirksam ist, dass sich ihr Nachweis der directen Beobachtung entzieht.

Unsere Beobachtungen lassen sich in zweifacher Weise verwerthen:

a) Vergleicht man eine 2·5 Minuten dauernde continuirliche Beleuchtung von etiolirten Keimlingen der Gerste oder des Hafers mit einer im Verhältnisse von 1:1 intermittirenden, fünf Minuten

[1] Untersuchungen über die Beziehungen des Lichtes zum Chlorophyll. Sitz. der k. Akad. der Wissensch. April-Heft 1874, pag. 25, 26.

dauernden Beleuchtung, so findet man, dass in beiden Fällen das Licht eine gleiche Zeit hindurch vorhanden war. Findet nun die Chlorophyllbildung gleichzeitig mit der Beleuchtung statt, so muss die Wirkung der continuirlichen Beleuchtung am Ende von 2·5 Minuten genau gleichkommen der Summe der einzelnen Wirkungen der intermittirenden Beleuchtung.

Thatsächlich ist aber am Ende der continuirlichen Beleuchtung entweder gar kein Chlorophyll oder doch keine irgend nachweisbare Menge desselben gebildet worden. Hingegen ist die Menge von Chlorophyll, welche bei intermittirender Beleuchtung entsteht, spectroskopisch zweifellos nachweisbar. Man muss sich daher vorstellen, dass zwischen Beleuchtung und Chlorophyllbildung eine gewisse Zeit verstreicht. Daraus folgt aber,

1. dass die Chlorophyllbildung ein Process photochemischer Induction ist.

b) Die erste spectroskopisch nachweisbare Spur von Chlorophyll tritt bei Dunkelkeimlingen von Gerste und Hafer nach fünf Minuten währender Beleuchtung auf, gleichgiltig ob die ganze Zeit hindurch oder nur im Verhältnisse von 1:1 Secunde beleuchtet wird. Man kann nicht annehmen, dass in dem einen Falle nur die halbe Menge von Chlorophyll gebidet wurde. Wenn ein alkoholischer Auszug den Absorptionsstreifen I des Chlorophyllspectrums eben noch zeigt, so wird er bei Verdünnung der Lösung auf das Doppelte offenbar verschwinden. Die kleinste für die Entstehung von Chlorophyll noch wirksame Lichtzeit wird mithin durch intermittirende Beleuchtung erreicht.

2. Bei Entstehung des Chlorophylls wird in gleicher Weise wie bei dem Zustandekommen heliotropischer Krümmungen durch eine continuirliche Beleuchtung Licht im Überschusse geboten.